

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008759095

WPI Acc No: 1991-263108/\*199136\*

XRAM Acc No: C91-114105

Incubating cells for biological laboratories - comprises circulating an incubating liq. in a cell incubator so liq. flows through a dialysing membrane

Patent Assignee: ASAHI MEDICAL CO LTD (ASAH )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No  | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| JP 3172170 | A    | 19910725 | JP 89309258 | A    | 19891130 | 199136 B |

Priority Applications (No Type Date): JP 89309258 A 19891130

Abstract (Basic): JP 3172170 A

Incubating cells comprises circulating an incubating liq. in a cell incubator, such that the liq. flows through a dialysing membrane into a 1st space of the incubator, while a basic incubating liq. flows in a 2nd space partitioned by the membrane from the 1st space.

USE- For biological laboratories. (6pp Dwg.No. 0/2)

Title Terms: INCUBATE; CELL; BIOLOGICAL; LABORATORY; COMPRISE; CIRCULATE; INCUBATE; LIQUID; CELL; INCUBATE; SO; LIQUID; FLOW; THROUGH; DIALYSE; MEMBRANE

Derwent Class: D16

International Patent Class (Additional): C12M-003/06; C12N-005/06

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): D05-H02

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-172170

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

C 12 M 3/06  
C 12 N 5/06

識別記号

庁内整理番号

8717-4B

⑬ 公開 平成3年(1991)7月25日

6807-4B C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 細胞の培養方法及び装置

⑮ 特 願 平1-309258

⑯ 出 願 平1(1989)11月30日

⑰ 発 明 者 吉 田 一 大分県大分市大字里2620番地 旭メデイカル株式会社内  
⑱ 出 願 人 旭メデイカル株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目1番1号  
⑲ 代 理 人 弁理士 佐々木 俊哲

明細書

1. 発明の名称

細胞の培養方法及び装置

2. 特許請求の範囲

① 細胞の成育する培養器に、培養液を循環させつつ細胞を培養し、この循環培養液を透析膜を内蔵する培養液処理器の第1の空間に循環し、一方、該透析膜で第1の空間と隔てられた、培養液処理器の第2の空間には、貯溜手段中で細胞の成育に必要なガス類の供給を受けた基礎培養液を循環させることを特徴とする細胞の培養方法。

② 細胞の成育する培養器と、培養液を培養器に循環する手段と、透析膜を内蔵する培養液処理器と、該培養液処理器の第1の空間に培養液を循環する手段と、培養液が循環する培養液処理器の第1の空間と透析膜で隔たてられた第2の空間に基礎培養液を循環する手段と、該基礎培養液を貯溜する手段と、貯溜した基礎培養液にガス類を供給する手段とからなることを特徴とする細胞の培養装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、透析膜を内蔵する培養液の処理部分を持つ細胞の培養装置及びそれを用いた培養方法であって、更に詳しくは、透析に使用する基礎培養液に酸素や炭酸ガス等を供給することによって、培養細胞に酸素や炭酸ガス等を供給する装置及び方法に関する。

(従来技術とその問題点)

動物は生存の為に呼吸により絶えず酸素を摂取している。この酸素摂取量が不足すると酸素欠乏により意識喪失や、場合によっては命に関わることは自明である。動物細胞の培養においても酸素の供給は必要である。動物細胞の大量培養では、単に培養細胞の生存だけでなく、培養細胞にとって十分な量の酸素を供給することが、大量培養の目的である細胞由来の種々の有用物質の生産性を高い状態で維持するためにも重要である。このため効率よく酸素を供給するために種々の工夫が成されている。

動物細胞の培養で用いられるほとんどの培養液は、気相の二酸化炭素濃度によって培養液のpHを最適に維持するように調整されており、酸素の供給と共に炭酸ガス濃度の維持もまた動物細胞の培養では必要である。

現在使用されている酸素や二酸化炭素等を含むガス類（通常大気に二酸化炭素を加えたもの、あるいはさらに酸素を加え、酸素濃度を高めたものが使用される）の供給法には、例えばタンク培養では単純にタンク上部の気相にガス類を吹き込む、培養液面で交換する液面交換法や、タンク内の培養液中に直接ガス類を吹き込むバブリング法、あるいはタンク内に設置したガス透過機能を持つ種々の素材からなる膜によりタンク内を培養液と気相とに区切り、膜を通してガス交換する方法等がある。

しかしながら液面交換法では

- ① 気相との接触面積が限られ、単位時間当りの交換量に限界があること、
- ② 培養液は細胞を浮遊させるため穏やかに攪拌さ

要であるがタンク内にガス交換膜などを設置することはこの攪拌による培養液の流れを乱す原因になり問題であること、などの問題点がある。

さらに大量培養法としては、例えば中空糸や不織布等を充填した培養チャンパーに、別に設けた培養液溜りポンプなどの送液手段によって培養液を強制的に送液することによって動物細胞を高密度に培養する方法がある（以下単に高密度培養と称す）。この高密度培養ではガス交換法としては上記タンク培養で用いられる方法を培養液溜りに対して行うほかに、ポンプなどの送液手段による培養液溜りから、細胞が高密度に生存する培養チャンパーへの培養液の送液が不可欠であるが、この時培養液溜りから培養チャンパーの途中に設けたガス透過性素材によってガス交換する方法も行われている。

この高密度培養においても、培養液溜りにおいて用いられるガス交換法では、剪断力等の細胞への影響を除き上記タンク培養法と同様の問題点が存在する。又培養液溜りから培養チャンパーの途中に

れているがこの攪拌による剪断力が細胞に対して悪影響を与えるため、攪拌速度は限られ、よって培養液全体への溶存ガスの拡散には限界があること、

- ③ 培養液表面に直接ガス類を供給するためこのガス類からの雑菌の汚染の危険性があること、

バブリング法では

- ① 培養液中に含まれる蛋白質によって培養液面に多くの気泡が生じ、この気泡の成長により、蓋等タンク上部のタンク外部との接続部が漏れ、それに起因する雑菌汚染が発生する危険性があること、

- ② 培養液中を上向する気泡は培養細胞に対して悪影響を与えること、

- ③ 液面交換法と同様、培養液表面に直接ガス類を供給するため、このガス類からの雑菌の汚染の危険性があること、

タンク内にガス交換膜を設置する方法では

- ① 装置が複雑になること、
- ② タンク培養では剪断力の問題より攪拌方法が重

設けたガス透過性素材によってガス交換する方法は優れた方法であるが、後述する培養液の透析装置を設ける場合、全体の構成は複雑になり、且つ十分なガス交換をするための表面積を確保するためにガス交換部分での培養液量は増加し、培養器と培養液溜り以外の部分を占める培養液量（デッドボリューム）が増加してしまい、例えば培養によりある蛋白質を生産しようとする場合、実際の培養液量にたいして回収できる培養液量は少なくなり、問題である。

本発明者は、先に特願平1-109119号（以下単に先願発明という）において、透析膜を内蔵する培養液処理器を持つ細胞の培養装置、及びそれを用いた培養方法を開発した。上記先願発明の要旨は下記のとおりのものである。

- ① 内部に細胞を保持し、細胞の成育空間内に機械的な培養液の均質化手段を持たない培養器に、培養液を循環させつつ細胞を培養し、この循環培養液を透析膜を内蔵する培養液処理器の第1の空間に循環し、一方、該透析膜で第1の空間と隔てら

れた第2の空間には基礎培養液を循環させることを特徴とする細胞の培養方法。

②内部に細胞を保持し、細胞の成育空間内に機械的な培養液の均質化手段を持たない培養器と、培養液を貯留する手段と、透析膜を内蔵する培養液処理器と、該透析膜で隔てられた第1の空間に培養液を循環する手段と、第1の空間とは異なる第2の空間に基礎培養液を循環する手段と、該基礎培養液を貯留する手段とからなることを特徴とする細胞の培養装置。

そして先願発明によれば、①培養液の循環手段による培養中の細胞に対する物理的悪影響がない、②培養液処理器の中空系外空間への細胞あるいは細胞片の着積が無く、このため培養の全期間中にわたり、透析膜の面積を有効に利用できる。③タンク内培養液の流れ障害の問題に由来する培養液の処理量の限界がない。④培養期間中にわたり、高い培養液の処理効率（透析効率）を維持でき、生産性が通常の培養法に比べて遙かに高い。⑤血清成分の使用量が少く、コスト的に優れ

と、該培養液処理器の第1の空間に培養液を循環する手段と、培養液が循環する培養液処理器の第1の空間と透析膜で隔てられた第2の空間に基礎培養液を循環する手段と、該基礎培養液を貯留する手段と、貯留した基礎培養液にガス類を供給する手段とからなることを特徴とする細胞の培養装置。

次に、本発明の特徴をその作用と共に具体的に説明する。

（作用）

これまでの細胞の大量培養では培養液とガス類とをいかに接触させ、ガス交換するかについて研究されてきた。これに対して本発明では一旦十分な量のガス類を基礎培養液に溶解させた後、この基礎培養液によって培養液を透析することによって培養液にガス類を供給しようとするものである。この時透析液側の基礎培養液の流速と、透析膜の面積を適当に選択することによって、基礎培養液に対して培養液を十分に透析でき、その結果培養液に十分な量の溶解ガス類を供給できる。基

ている。等の顕著な作用、効果を奏する。

本発明者は、先願発明において透析に使用している基礎培養液槽にガスをバブリングさせ、十分にガス交換された基礎培養液によって培養液を透析することにより、栄養物や老廃物と同時にガスもまた交換する方法について研究し、非常に優れた培養液へのガス類の供給方法であることを見だし、本発明を完成したものである。

（問題点を解決するための手段）

即ち、本発明の要旨は下記のとおりのものである。

①細胞の成育する培養器に、培養液を循環させつつ細胞を培養し、この循環培養液を透析膜を内蔵する培養液処理器の第1の空間に循環し、一方、該透析膜で第1の空間と隔てられた、培養液処理器の第2の空間には、貯留手段中で細胞の成育に必要なガス類の供給を受けた基礎培養液を循環させることを特徴とする細胞の培養方法。

②細胞の成育する培養器と、培養液を培養器に循環する手段と、透析膜を内蔵する培養液処理器

に基礎培養液槽にガス類をバブリングさせることによってガス交換できることは、装置的にも非常に簡単である。

さらに本願発明の効果としては、従来の、培養液槽にガス類を吹き込む方法では吹き込んだガス類により雑菌の汚染を生じる可能性があったが、本願発明の方法では培養液とは透析膜を隔てて隔離されており、ガス類供給の際事故によりもし雑菌で基礎培養液が汚染されたとしても、雑菌は透析膜を経て培養液側へ移行することはなく、早期に対処すれば貴重な細胞を無駄にすることがない。この点は実際の大量培養では実用的であり、非常に有用である。

第1図、第2図は、それぞれ本発明のシステム例を示すもので、本発明の培養装置は、細胞が成育する培養器（1）と、培養液を貯留する培養液槽（3）と、培養液の連続的循環手段（4）とを持つ動物細胞の培養装置であって、ポンプ等の培養液の連続的循環手段（4）により細胞が成育する培養器（1）に強制的に培養液を循環させる。

培養液溜(3)より培養液循環手段(4)により培養器(1)を経て培養液を透析膜で区切られた培養液処理器(2)の第1の空間に送る。基礎培養液溜(6)ではガス類供給口(7)から酸素等のバブリングを行った後、基礎培養液循環手段(5)により、該基礎培養液を透析膜にて区切られた培養液処理器(2)の第2の空間に送り、透析によって低分子量成分及びガス類の交換、即ち老廃物の除去と栄養素及び酸素の補給を行った後、培養液を、再び培養液溜(3)に戻す(第1図)。第2図のシステムは、培養液溜(3)から培養器(1)への循環回路とは別に、培養液溜(3)より直接培養液循環手段(8)により透析膜にて区切られた培養液処理器(2)の第1の空間に培養液を送り、第2の空間に送られる基礎培養液に対して、透析によって低分子量成分及びガス類の交換、即ち老廃物の除去と栄養素及び酸素の補給を行った後、培養液を再び培養液溜(3)に戻すものである。基礎培養液は基礎培養液溜(6)でガス類供給口(7)からの酸素等のバブ

度沸騰して脱気したRPMI-1640に、10%濃度に牛胎児血清を添加した培養液1.0ℓを加えて、ポンプ(4)(東京理化学器械社製、MP-3)を用いて、培養液処理器(2)(旭メディカル社製、血液透析器AM1000-HP)との間で、流速およそ10ml/分で循環させた。一方基礎培養液溜(6)(柴田科学社製、5ℓカルチャーボトル)には基礎培養液であるRPMI-1640を5ℓ入れ、溶存酸素濃度測定5時間前より1ℓ/分で空気をガス供給口(7)からバブリングさせた。基礎培養液はポンプ(5)(旭メディカル社製、血液ポンプABP-01)により培養液処理器(2)の培養液と透析膜を隔てた第2の空間に、流速およそ200ml/分で培養液の送液方向と逆方向に循環させた。1ℓのカルチャーボトル、5ℓのカルチャーボトル共、テフロン製攪拌子を入れておよそ120回転/分で攪拌した。この時1ℓカルチャーボトル内で培養液中の溶存酸素濃度を、カルチャーフローT/C-1000(旭メディカル社製)付属のDO電極に

リングをうける。ここで言う培養器について、具体的に例をあげると、例えば中空糸を用いたもの、不織布、スポンジ、セラミックス等の多孔体、高分子製のマイクロカプセルやビーズを充填したカラムなどがある。培養液処理器に使用する透析膜は平膜でも使用可能であるが、決められた容積でより多くの膜面積が得られる中空糸がより有効である。透析膜に開いた細孔径は分離分子量で100,000ダルトン以下、あるいは50,000ダルトン以下がよい。望ましくは1000ダルトン以上30,000ダルトン以下がよい。透析膜の膜面積は培養器にて培養する細胞数や細胞の種類によって決まり、特に規定は不要である。

以下に具体例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

#### (実施例1)

タンク培養装置に本発明を実施した例を、第1図で説明する。培養液溜(3)として1ℓのカルチャーボトル(柴田科学社製)を用い、これに一

て測定した。

対象として、蒸留水を1度沸騰して脱気した溶存酸素濃度が0.0ppm、500mlの蒸留水に、1分間に1ℓの流量で空気を3時間バブリングさせた時の溶存酸素濃度が6.8ppmとなるように、DO電極の出力を調整して用いた。尚、測定は全て室温(26~28℃)で行った。結果を第1表に示す。

第1表 (ppm)

|        | 透析開始前 | 透析24時間後 |
|--------|-------|---------|
| DO電極出力 | 0.2   | 6.4     |

培養液の溶存酸素濃度は、透析開始以前には脱気した蒸留水と同様に0であったが、透析24時間後には6.4とほぼ飽和濃度に近い濃度になった。またこの時基礎培養液溜ではバブリングによる気泡は液面で直ちに消失し、長時間消失しないような気泡は生じなかった。

以上より本発明によって培養液に酸素を十分に供給できること、基礎培養液には培養液と異なり

気泡による雑菌汚染は起こらないことが明らかである。

(実施例2)

中空系を用いた高密度培養に本発明を実施した例を、第1図で説明する。培養細胞として抗ヒトIgGモノクローナル抗体生産性ハイブリドーマSS-16を、培養器(1)としてカルチャーフローM(旭メディカル社製)を用い、培養液溜(3)(1ℓカルチャーフローT/C-1000付属)に10%牛胎児血清を含むRPMI-1640培養液0.5ℓを加えて、ポンプ(4)(カルチャーフローT/C-1000付属)を介して培養液処理器(2)(旭メディカル社製、血液透析器AM1000-HP)との間で循環させた。流速は培養状態により任意に調節した。一方、基礎培養液溜(6)(柴田科学社製、5ℓカルチャーボトル)には基礎培養液としてRPMI-1640にカナマイシン50mg/ℓ添加したものを5ℓ入れ、1ℓ/分で5%二酸化炭素を含む空気をガス供給口(7)からバブリングさせた。

最初 $2 \times 10^4$ 細胞より培養を開始し、培養10日目には $1.2 \times 10^8$ 細胞(細胞密度 $1.2 \times 10^4$ 細胞/ℓ)に達した。この細胞の増殖にもかかわらず、溶存酸素濃度はほぼ一定であった。細胞密度 $1.2 \times 10^4$ 細胞/ℓは通常の培養法( $10^4$ 細胞/ℓ)に比べて遙かに高い密度であるにもかかわらず、十分な量のガス類の供給が行われていることが分かる。またこの時基礎培養液溜(6)には長時間消失しないような気泡は生じなかった。

(発明の効果)

本発明の培養装置及び方法は、透析に使用する基礎培養液に酸素や炭酸ガス等のガス類を供給することによって、培養細胞に酸素や炭酸ガス等のガス類を効率よく供給するものであり、且つ培養器に直接ガス類を供給するものでないから、攪拌による細胞への尖断力の影響がない、雑菌汚染の危険性がない、気泡による培養細胞への悪影響がない、装置がシンプルであるなど、その効果は顕著なものがある。

この基礎培養液はポンプ(5)(旭メディカル社製、血液ポンプABP-01)により培養液処理器(2)の培養液と透析液を隔てた第2の空間に、流速およそ50ml/分で循環させた。1ℓのカルチャーボトル、5ℓのカルチャーボトル共、テフロン製攪拌子を入れておよそ60回転/分で攪拌した。

上記培養器、培養液溜はカルチャーフローT/C-1000内にセットして培養した。培養液中の溶存酸素濃度は、カルチャーフローT/C-1000(旭メディカル社製)付属のDO電極にて、培養液処理器の出口側(培養液溜の入口側)で培養液中の溶存酸素濃度を測定した。DO電極の調製は実施例1と同様にして行った。結果を第2表に示す。

第2表

|       | 生細胞数              | 溶存酸素濃度 |
|-------|-------------------|--------|
| 培養開始時 | $2 \times 10^4$   | 6.2ppm |
| 培養5日  | $6.1 \times 10^4$ | 5.7    |
| 培養10日 | $1.2 \times 10^8$ | 5.5    |

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例に示したシステム例である。

第2図は、本発明の別のシステム例である。

- |           |              |
|-----------|--------------|
| 1. 培養器    | 2. 培養液処理器    |
| 3. 培養液溜   | 4. 5. 8. ポンプ |
| 6. 基礎培養液溜 | 7. ガス類供給口    |

代理人 弁理士 佐々木 俊哲

図 1

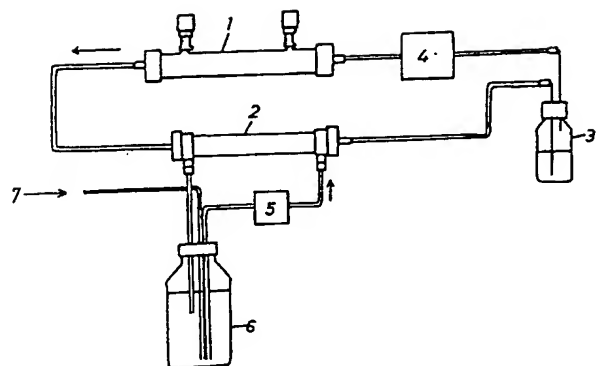


図 2

